

デヒドロエピアンドロステロン投与における 雌ラット乳腺の超微構造的変化に関する研究

金沢大学医学部産科婦人科学講座 (主任: 西田悦郎教授)

鈴木 信 孝

副腎性アンドロゲンであるデヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHA) と乳腺との関連性を考究するために, DHA を雌ラットに投与し乳腺に及ぼす影響を組織学的に検討した. 生後50日齢のウィスター (Wistar) 系雌ラットに両側卵巢摘除を施し, 60日齢よりそれぞれラット体重 100g あたりデヒドロエピアンドロステロン・アセテート (DHA-acetate, DHA-Ac) 0.1mg/回 (少量投与群), 5mg/回 (多量投与群) を週3回の割合で, 計1, 3, 7, 14, 28回投与した. それぞれ最終投与から48時間後に乳腺を摘出し, その形態学的変化についてホルマウント法, 光学顕微鏡, 電子顕微鏡を用いて検討した. DHA-Ac 少量投与群では, 腺管の伸長と分岐数の増加がみられたが, 腺房系の発育は認められなかった. 腺上皮には分泌物として脂肪滴がわずかに認められたが, タンパク顆粒はほとんど認められなかった. DHA-Ac 多量投与群では, 7回投与群までは腺管は発育し, 腺房も著明に発育した. 腺上皮には脂肪滴とタンパク顆粒が著明に増加し, 腺腔にはこれらの分泌物が充満していた. しかし, 14回投与群で乳腺の発育は停止し, 28回投与群では逆に退縮した. 間質には投与回数が増えるに伴って多くの肥満細胞の浸潤が認められた. なお, 今回の実験で脂肪滴の生成途上の像が観察された. 小～中等大の脂肪滴は数層の粗面小胞体に囲まれ, ポリゾームと腫大したミトコンドリアが脂肪滴に近接していた. 以上の所見より, DHA-Ac 投与は乳腺に対し著明な発育と分泌物の生成をもたらすが, 投与回数が増すにしたがい乳腺を退縮させる作用を有すること, 脂肪滴生成には粗面小胞体, ポリゾーム, ミトコンドリアが深く関与していることが示唆された.

Key words dehydroepiandrosterone, lipid droplet, mammae, rat, ultrastructure

デヒドロエピアンドロステロン (dehydroepiandrosterone, DHA) をはじめとする副腎性アンドロゲン (adrenal androgens) は, 思春期以前に急激に分泌が増加し^{1)~3)}, この現象は副腎皮質機能亢進徴候発現 (adrenarche) と呼ばれている. この副腎皮質機能亢進徴候発現は, 性腺機能亢進徴候発現 (gonadarche) として知られる視床下部-下垂体-性腺系の成熟以前に認められることから, 思春期の発来に密接な関与があるとされている^{4)~7)}.

女性では, 思春期になると性毛 (腋毛・陰毛) の発生, 乳房発育, 初経などの第二次性徴が出現してくる. このうち乳房発育は思春期の初期から開始されるとされ, 性毛の発生時期とはほぼ期を一にしており, 初経 (menarche) はこれよりも2~3年遅れて発来することが知られている. 一般に思春期における乳房発育は, 卵巣性ホルモンの影響で発育するとされているが, その開始がむしろ副腎皮質機能亢進徴候発現の時期に一致しているので, 副腎性アンドロゲンである DHA も乳房の発育になんらかの作用を及ぼしている可能性が示唆される.

乳房の発育は, 乳腺, 皮下脂肪組織および乳腺間質の増殖によってもたらされる. 乳腺は性周期に伴い増殖, 分泌, 退縮と変化を繰り返し, また妊娠, 分娩, 産褥等の際には複雑な変化を示す. これらの変化は性ホルモンやプロラクチンなどの影響によるものとされているが, DHA との関連性について検討した報告は少ない. なお, 各種ホルモンの乳腺に与える影響につ

いては, これまで形態学的に調べられてきているが, その大部分は光学顕微鏡 (光顕) による観察が主であり, 電子顕微鏡 (電顕) によって超微構造的変化を観察した報告は必ずしも多くない⁸⁾.

本研究では, DHA の乳腺発育に及ぼす影響を検索する目的で, デヒドロエピアンドロステロン・アセテート (dehydroepiandrosterone acetate, DHA-Ac) を卵巢摘除ラットに投与し, その投与量・投与回数による乳腺の形態学的変化を, 特にその超微構造的変化の面から究明した.

材料および方法

I. 実験動物

生後40日齢のウィスター (Wistar) 系雌ラット (日本チャールズ・リバー, 厚木) を購入し, 10日間膣スメアを観察して規則的な性周期を有するもののみを実験に供した. 50日齢にエーテル麻酔下に背部切開により両側卵巢を摘出し, その後10日間膣スメアを観察して, 性周期のないことを確認した. 飼育条件としては, 室温を 23±2℃ に保ち, 人工照明は午前5時より午後7時までの14時間とし, 飼料 (オリエンタル NMF ラット繁殖用, オリエンタル酵母工業, 東京) と飲料水は自由摂取とした.

II. 実験方法

1. DHA 製剤とその投与法

DHA 製剤 (DHA-Ac) および油溶媒 (ゴマ油) は帝國臓器製薬

平成5年12月8日受付, 平成5年12月24日受理

Abbreviations: DHA, dehydroepiandrosterone; DHA-Ac, dehydroepiandrosterone acetate

(東京) 作製のもので、DHA-Ac は 1mg/ml あるいは 50mg/ml となるようその濃度を調整して使用した。投与部位は、乳腺の損傷を避けるためラット背部を選んだ。投与に際しては、24ゲージ針を用い、刺入部位より約 1cm 皮下に通した後上記製剤を注入し、その後刺入部位をしばらく圧迫し漏れのないことを確認した。

2. DHA-Ac の投与回数と投与量

実験群は、薬剤の投与量によりそれぞれ 1) 対照群 (油溶媒, 1 回投与量 0.1ml/100g 体重), 2) DHA-Ac 少量投与群 (1 回投与量 0.1mg/100g 体重), 3) DHA-Ac 多量投与群 (1 回投与量 5mg/100g 体重) の 3 群に分け、さらにその投与回数から 1) 1 回投与, 2) 3 回投与, 3) 7 回投与, 4) 14 回投与, 5) 28 回投与の 5 群とし、計 15 群、1 群 5 匹、総計 75 匹の雌ラットで比較検討した。DHA-Ac および油溶媒を生後 60 日齢以降に月、水、金曜日の週 3 回、15時から19時までの間に投与し、各実験群の最終投与の 2 日後に乳腺を摘出し実験に供した。

3. ホールマウント (whole mount) 試料の作製および観察
ホールマウントの乳腺試料としては右鼠径部乳腺を選んだ。乳腺部を大きく切り出した後、それを濾紙上に広げ、そのまま 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定、そののち水洗し、2% カルミン染色液で 2 時間染色した。再度水洗の後、上昇エタノール系列で脱水し、サリチル酸メチル (methyl salicylate) で透明化し、実体顕微鏡下で観察した。

4. 光顕試料の作製

光顕の乳腺試料としては左鼠径部乳腺を選んだ。乳腺部位を切り出した後、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin, H.E.) 染色を行った。また、切り出した乳腺の一部は凍結切片とし、ズダンⅢ (Sudan Ⅲ) 染色を行った。

5. 透過電顕試料の作製

左鼠径部乳腺の一部を 1mm 角に細切し、1% グルタルアルデヒドと 4% ホルマリンの混合液 (0.1M カコシル酸緩衝液で PH7.4 に調整) で 1 時間固定した。なお、一部の乳腺試料は同

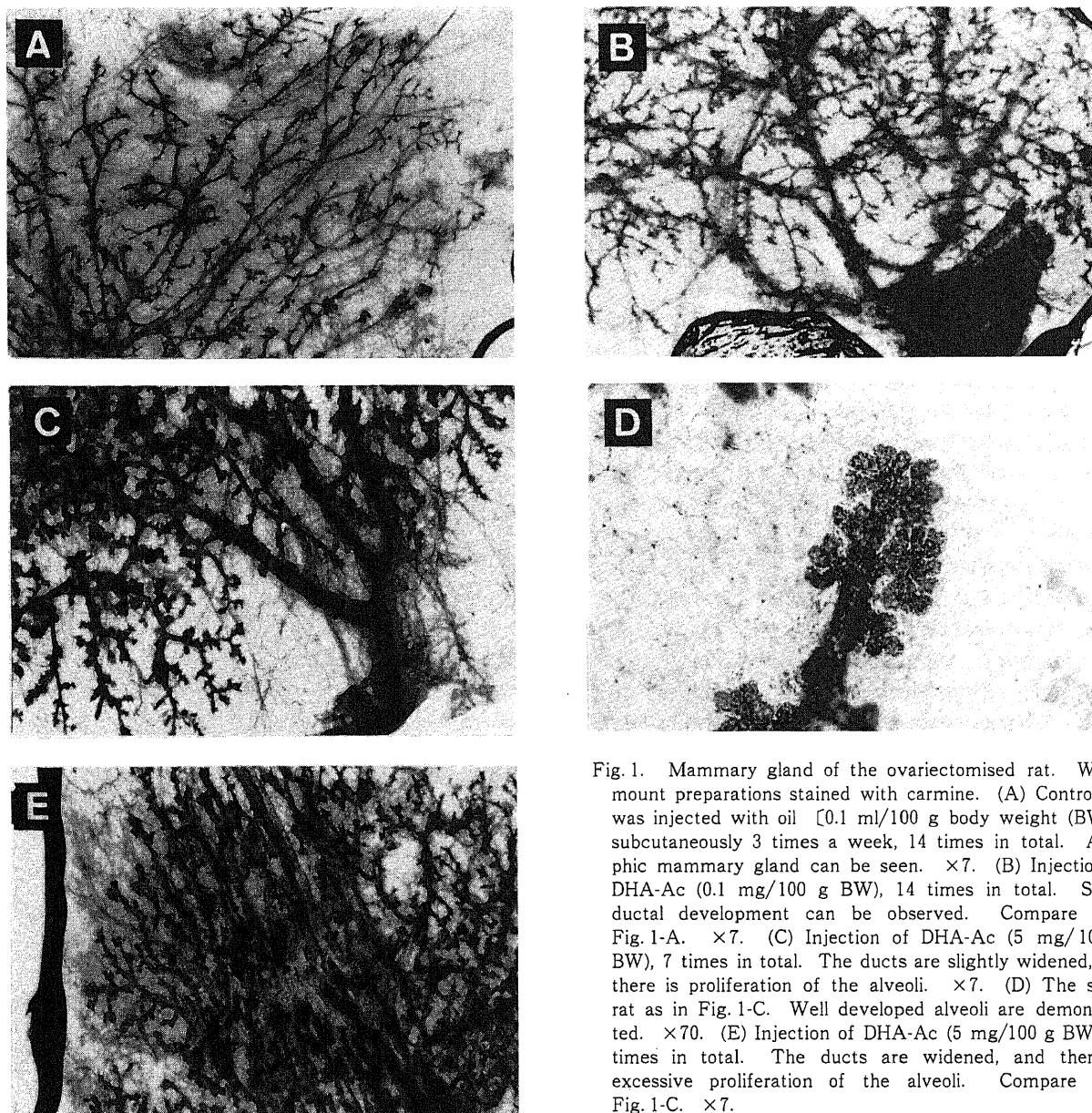


Fig. 1. Mammary gland of the ovariectomized rat. Whole mount preparations stained with carmine. (A) Control rat was injected with oil [0.1 ml/100 g body weight (BW)] subcutaneously 3 times a week, 14 times in total. Atrophic mammary gland can be seen. $\times 7$. (B) Injection of DHA-Ac (0.1 mg/100 g BW), 14 times in total. Slight ductal development can be observed. Compare with Fig. 1-A. $\times 7$. (C) Injection of DHA-Ac (5 mg/100 g BW), 7 times in total. The ducts are slightly widened, and there is proliferation of the alveoli. $\times 7$. (D) The same rat as in Fig. 1-C. Well developed alveoli are demonstrated. $\times 70$. (E) Injection of DHA-Ac (5 mg/100 g BW), 14 times in total. The ducts are widened, and there is excessive proliferation of the alveoli. Compare with Fig. 1-C. $\times 7$.

液で灌流固定したものを用いた。その後、2% オスミウム酸 (0.1M カコジル酸緩衝液で PH7.4 に調整) で 1 ~ 2 時間固定し、さらに上昇エタノール系列で脱水し、エボン812 (応研商事, 東京) で包埋した。試料をウルトラトームで超薄切片とし、酢酸ウラニール・硝酸鉛の二重染色を施した。観察には HU-600 (日立, 東京), JEM-1210 型 (日本電子, 東京) 電子顕微鏡を用い、1,200~10,000倍の直接倍率で観察した。

成 績

1. ホールマウント標本の所見

1. 対照群 (図 1-A)

去勢後日数の経過と共に乳腺は著しく退縮した。すなわち小葉 (lobules) の腺管 (duct) は狭細化し、腺房は萎縮した。

2. DHA-Ac 少量投与群

7 回投与群までは、投与回数の増加に伴って乳腺は発育し、乳野 (mammary area) は拡大した。腺管は軽度に伸長し、分枝数の増加を認めたが、腺房系の発育はほとんど認められなかった。しかし、14回投与群 (図 1-B) では、乳腺の発育は停止し、さらに28回投与群では、腺管および腺房の退縮傾向が出現し、乳野は縮小した。

3. DHA-Ac 多量投与群

14回投与群までは、投与回数の増加に伴って乳腺は著しく発育し、乳野は拡大した。腺管は伸長し、腺管の分枝数も増加した。また、腺房の著しい発育と腺房数の増加が認められた (図 1-C, D, E)。しかし、28回投与群では、逆に乳腺は退縮傾向を示し乳野は縮小した。

II. 光顕所見

1. 対照群

去勢後日数が経過すると共に腺上皮は退縮し、相対的に間質

の割合が増加していた。腺腔には分泌物の貯留をほとんど認めなかった。

2. DHA-Ac 少量投与群 (図 2-A)

14回投与群までは、腺上皮細胞は対照群と比較して著変は認めなかった。28回投与群においては、腺上皮に空胞をわずかに認めた。間質はいずれの群においても対照群より密であった。

3. DHA-Ac 多量投与群 (図 2-B, C)

乳腺上皮は増殖し分泌物の生成も増加したが、投与回数が14回を越えると上皮の増殖は停止し、退縮傾向が出現した。すなわち、1 回投与群では、乳腺上皮に明らかな変化は認められなかったが、3 回投与群では、腺管の発育と腺房数の著しい増加を認め、腺上皮と腺腔には分泌物が認められた。間質には肥満細胞が認められた。7 回投与群では、腺房はさらに発育し、腺上皮や腺腔には多量の好塩基性分泌物と多数の空胞が認められた。これらの空胞はズダンⅢ染色によってオレンジ色に染色された。14回投与群では、7 回投与群とは異なり、乳腺上皮の発育は停止した。腺腔には好中球やマクロファージ (macrophage) が認められ、余剰な分泌物の食食されている像が観察された。間質には多くの肥満細胞が認められた。28回投与群では、14回投与群と比較して腺房の径は縮小し、乳腺は退縮傾向を示していた。

III. 透過電顕所見

1. 対照群 (図 3)

腺上皮の細胞質には多数のライソゾーム (lysosome) がみられ、変性に陥った細胞が多数観察された。また、腺上皮間にはマクロファージの侵入がみられた。筋上皮細胞の核は丸く、筋原線維は減少し、基底側は凹凸不整となっていた。間質の膠原線維は著しく増加していた。

2. DHA-Ac 少量投与群 (図 4-A, B)

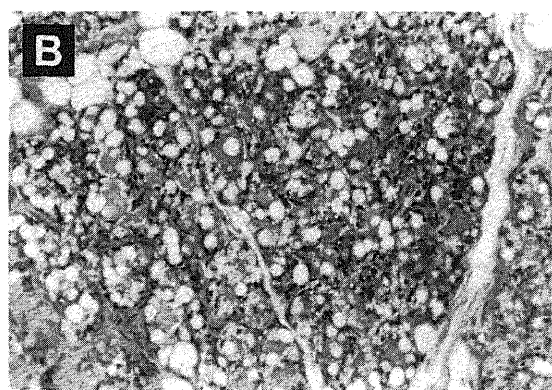
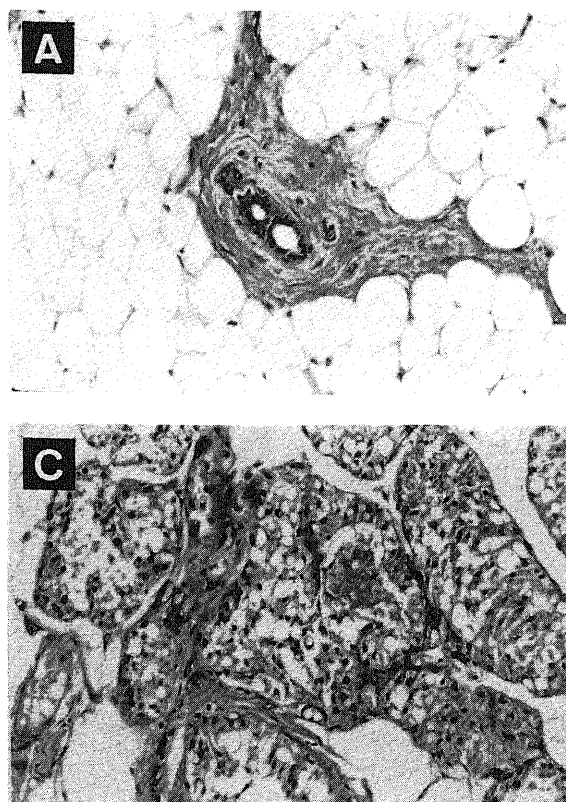


Fig. 2. Mammary gland of the ovariectomised rat. Light microscopic photographs stained with hematoxylin and eosin. (A) Injection of DHA-Ac (0.1 mg/100 g BW), 28 times in total. Note dense interlobular fibrous tissue. $\times 125$. (B) Injection of DHA-Ac (5 mg/100 g BW), 7 times in total. Marked lobulo-alveolar development. $\times 125$. (C) Injection of DHA-Ac (5 mg/100 g BW), 28 times in total. Involved mammary gland. Compare with Fig. 2-B. $\times 125$.

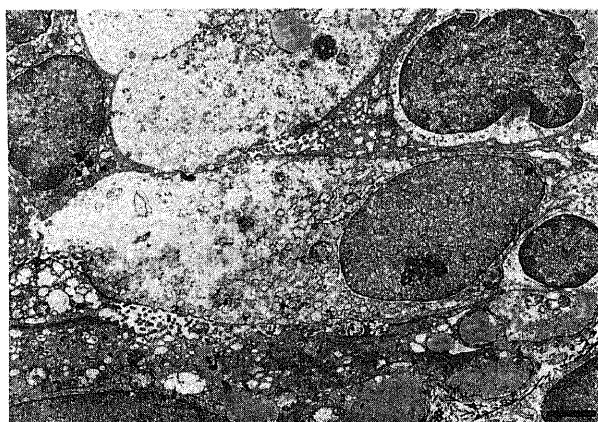


Fig. 3. Electron micrograph of mammary gland of the ovariectomised rat. Injection of oil (0.1 ml/100 g BW), 7 times in total. Atrophic changes of epithelial cells can be seen. Note autolysis of epithelial cells. Scale bar indicates 2 μ m.

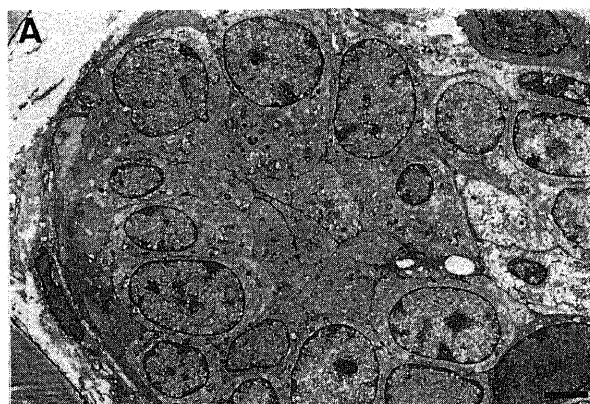


Fig. 4. Electron micrographs of mammary gland of the ovariectomised rat. (A) Injection of DHA-Ac (0.1 mg/100 g BW), one time in total. The epithelial cell contains roughly round or oval nucleus, scanty rough-surfaced endoplasmic reticulum, many mitochondria and a few lipid droplets. The lumen is closed yet. Myoepithelial cells are dark, spindle shaped, and surround the ductule in an interlacing pattern. The general ultrastructural appearance is almost normal except for prominent perinuclear chromatin. Scale bar indicates 3 μ m. (B) Injection of DHA-Ac (0.1 mg/100 g BW), 28 times in total. Some alveolar cells are filled with small lipid droplets (L), but protein secretory granules can not be observed. Scale bar indicates 3 μ m.

1回投与群から14回投与群においては、乳腺上皮に増殖像も退縮像も認められなかった。28回投与群では、腺腔への脂肪滴の分泌は認められなかったが、上皮には脂肪滴の増加が認められた。しかし、タンパク性分泌物の生成は認められなかった。

3. DHA-Ac 多量投与群

多量投与群における腺上皮と間質の所見は、投与回数別にみると以下のごとくであった。

1) 1回投与群 (図5)

乳腺上皮の増殖像が認められた。すなわち、腺上皮細胞の辺縁は不規則で、核は辺縁不整で著明な陥凹を示し、明瞭な核小体と核縁には顕著なクロマチン (chromatin) の凝集を認めた。上皮の粗面小胞体 (rough-surfaced endoplasmic reticulum) やゴルジ装置 (Golgi apparatus) の発達は顕著ではなかったが、遊離リボソーム (free ribosome), ポリソーム (polysome) およびミトコンドリア (mitochondria) の数は増加していた。上皮にはタンパク顆粒は認められなかったが、上皮細胞の核上部には脂肪滴が認められ、その数は対照群と比較して多かった。腺腔はやや拡張していたが、分泌物の貯留はほとんど認められなかった。筋上皮細胞は対照群と比べ肥大し、核は長楕円形でしばしば深い陥凹を有し筋原線維が豊富に認められた。筋原線維間には暗調小体 (dense body) が散在していた。筋上皮細胞の細胞内小器官は少なかったが、基底側には拡張した粗面小胞体を認めた。間質には分界線維芽細胞 (delimiting fibroblast) の増殖がみとめられた。線維芽細胞の粗面小胞体はよく発達し著明に拡張していた。

2) 3回投与群 (図6-A, B)

腺上皮細胞の増殖は、1回投与群に比べさらに明瞭なものとなった。核は細胞質内分泌物の貯留により基底側へ圧排され、胞体は遊離リボソームとポリソームの増加によりやや暗調となっていた。上皮の基底部には被覆小胞 (coated vesicle) が多数みられた。胞体内には拡張し発達した多数の粗面小胞体が認められた。ミトコンドリアも数多くみられたが、一部は巨大化し内部のクリスタが疎になっているものが認められた。ゴルジ

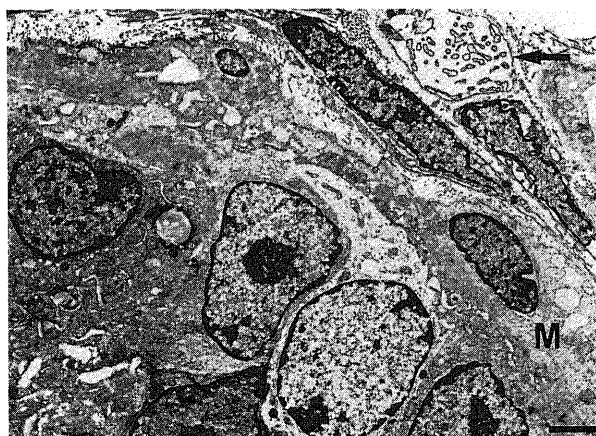


Fig. 5. Electron micrograph of mammary gland of the ovariectomised rat. Injection of DHA-Ac (5 mg/100 g BW), 1 time in total. The nuclei are irregular and contain prominent nucleoli. The perinuclear chromatin stains darkly. Note the active fibroblasts with enlarged cisternae of rough-surfaced endoplasmic reticulum (arrow). The myoepithelial cell (M) is slightly hypertrophied and contains indented nucleus. Scale bar indicates 2 μ m.

装置は、かなりよく発達した層板 (Golgi lamellae) と多数の小胞 (Golgi vesicle) を有し、層板から生じた空胞 (Golgi vacuole) にはカゼイン粒子 (casein particle) と思われる径の大きなタンパク性分泌物が認められた。空胞内のカゼイン粒子は通常1個のみ観察され、丸く、高電子密度であった。腺腔に面したカゼイン粒子は主として開口分泌 (exocytosis) によって腺腔へ分泌されていた。腺腔内カゼイン粒子には後述するような、結晶状物質の付着はみられなかった。腺上皮細胞内には大小さまざまな脂肪滴が充満し、一部は腺腔にアポクリン分泌 (apocrine secretion) の形式で分泌されていた。また、上皮内分泌物の周囲にはライソゾームが多数みられた。腺腔は著明に拡張し、内部には主としてタンパク顆粒と微細線維状の分泌物が充満していた。腺腔側の微絨毛 (microvilli) はアポクリン分泌の

ため欠如していることが多かった。なお、グリコーゲン顆粒 (glycogen granules) はあまり観察されなかった。筋上皮細胞は肥大し、筋原線維が豊富にみられ、飲小胞は増加していた。間質の膠原線維は減少し、分界線維芽細胞には著明に拡張した粗面小胞体が認められた。間質には、肥満細胞が数多くみられた。肥満細胞は主として毛細血管周囲にみられたが、腺上皮の基底膜に近接して認められることも多かった。腺房周囲の毛細血管はよく発達し、血管内皮細胞は未分化な形態を示し、核は大きく、細胞質にはリボゾームや粗面小胞体が多数存在していた。毛細血管の内腔は比較的大きく、内腔に面するところには飲小胞が多く認められた。

3) 7回投与群 (図7)

乳腺上皮は、3回投与群に比しさらに分化を遂げていた。腺房の外周は凹凸不整となり、乳腺上皮細胞内には巨大な脂肪滴が貯留し、核は基底側に圧排されていた。また、タンパク性分泌物の貯留によって大きな貯留空胞 (stasis vacuoles) が形成さ

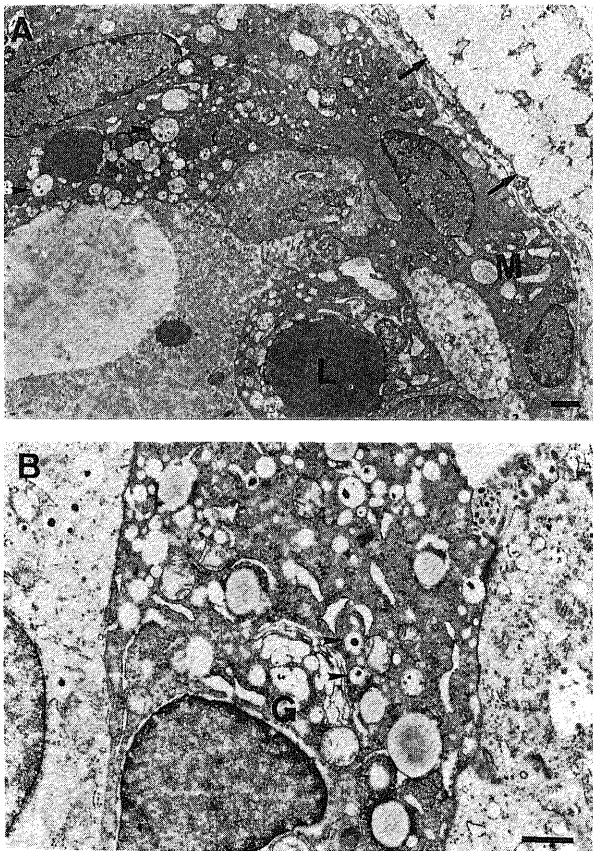


Fig. 6. Electron micrographs of a mammary gland of the ovariectomized rat. (A) Injection of DHA-Ac (5 mg/100 g BW), 3 times in total. A survey view of the secretory epithelium. The luminal poles of the epithelial cells show numerous dilated Golgi vacuoles containing protein secretory granules (arrowheads). Large lipid droplets (L) can be visible in the cytoplasm. Filamentous secretory materials can be noted in the lumen. The myoepithelium (M) is situated outside of the glandular cells and covered with a thin basement membrane. A mast cell is observed at the upper right corner (arrows). Scale bar indicates 1 μ m. (B) The same rat as in (A). The hypertrophied Golgi apparatus (G) of an epithelial cell and its neighborhood. Increased number of free ribosomes and polysomes are present in the cytoplasm. Swollen mitochondria are also demonstrated. Protein secretory granules are contained in dilated vacuoles of the Golgi apparatus (arrowheads). Scale bar indicates 1 μ m.

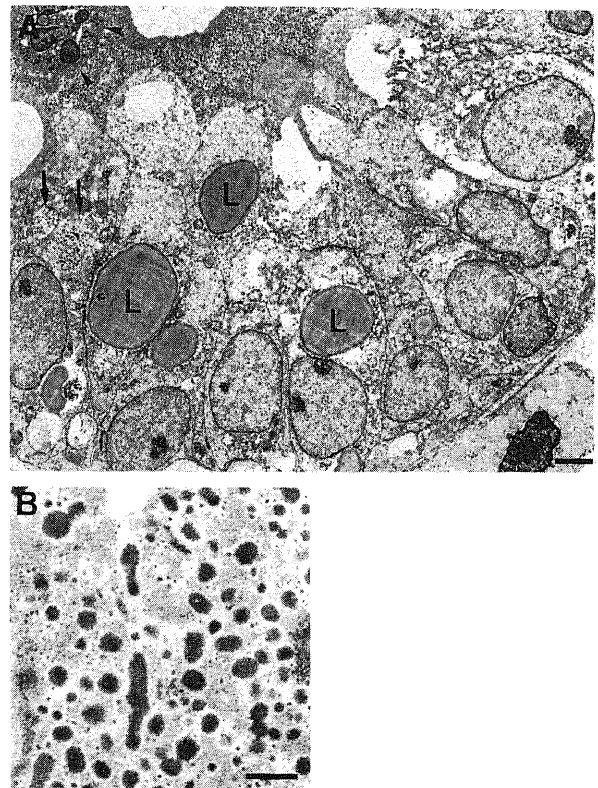


Fig. 7. Electron micrographs of a mammary gland of the ovariectomized rat. Injection of DHA-Ac (5 mg/100 g BW), 7 times in total. A survey view of the secretory epithelium. Two large stasis vacuoles containing protein secretory granules are present (arrows) and they are bordered by a distinct membrane. The lipid droplets (L) are not extruded, but are stored in the cytoplasm. The superapical segment of cytoplasm is being sloughed into the lumen by the partial dissolution of the plasma membrane. Microvilli are short and not easily seen. Alveolar lumen contains abundant protein secretory granules, some of which are contained in a leukocyte by phagocytosis (arrowheads). A mast cell is observed at the lower right corner. Scale bar indicates 3 μ m. (B) The same rat as in (A). High power view of the lumen. Note the regular periodic band pattern and dot pattern of the protein secretory granules. Scale bar indicates 0.5 μ m.

れていた。ミトコンドリアは3回投与群より多く認められた。腺腔側の微絨毛はほとんど欠如しており、胞体先端の細胞質が腺腔に脱落している像が認められた。腺腔は3回投与群に比し拡張し、内部には無数のタンパク性分泌物や脂肪の分泌を認めた。腺腔には多核白血球が認められた。また、マクロファージ様細胞による脂肪貪食像が認められた。腺腔のタンパク性分泌物には特徴的な縞状の模様がみられ、3回投与群までのものとは形状が異なっていた。筋上皮細胞は伸展し扁平化していた。間質は浮腫状であり、分界線維芽細胞の増殖と肥満細胞の著明な浸潤を認めた。

4) 14回投与群 (図8)

7回投与群までとは異なり、腺上皮細胞には機能低下像が認められた。すなわち、一部細胞内小器官の減少が認められ、腺腔には多量の分泌物が貯留し、その周りには多数のライソゾームが認められた。なお、この群において、拡張した粗面小胞体の内部に脂肪が貯留している像が観察された (図8)。筋上皮細胞は、7回投与群よりもさらに伸展し、扁平となっていた。間質は減少し、肥満細胞は7回投与群に比し増加していた。

5) 28回投与群 (図9, 図10)

乳腺上皮には、14回投与群に比し明らかな退縮像が認められた。すなわち、ミトコンドリアや粗面小胞体等の細胞内小器官は著減し、発育の悪いゴルジ装置が観察された。特徴的な所見として巨大ミトコンドリア (giant mitochondria) が認められた。すなわち、ミトコンドリアは腫大し、内部のクリスタは減少し疎になっていた。遊離リボソームやポリゾームは著減していたが、一部のポリゾームは渦状に集合し、主に脂肪滴周辺で観察された。細胞内小器官の減少に伴って、脂肪滴やタンパク性分泌物の量は減少していた。腺腔には、14回投与群と比較すると量的には少ないものの、脂肪とタンパク性分泌物の貯留が認められた。間質は、14回投与群と同様に浮腫状となっており、多くの肥満細胞が認められた。

なお、この群では生成途上の脂肪滴が数多く観察された。す

なわち、脂肪滴が数層の粗面小胞体によって囲まれ、ミトコンドリアが粗面小胞体の外側に近接している像や、脂肪滴とミトコンドリアが近接しそれらを数層の発達した粗面小胞体が包囲している像が観察された。一部には、ポリゾームが渦状に集合しその中心部に脂肪とみられる分泌物が生成されている像や、生成途上のタンパク性分泌物と脂肪が同一の粗面小胞体に囲まれている像などが認められた。また、拡張した粗面小胞体の内部に、脂肪と思われる分泌物が貯留している像が認められた。

考 察

乳腺の発育には種々のホルモンが関与しており、乳腺に影響を与えるホルモンとしてはエストロゲン (estrogen)、プロゲステロン (progesterone)、テストステロン (testosterone)、プロラクチン (prolactin)、インスリン (insulin)、成長ホルモン (growth hormone)、甲状腺ホルモン (thyroid hormone)、コルチゾール (cortisol)、デオキシコルチコステロン (deoxycorticoste-

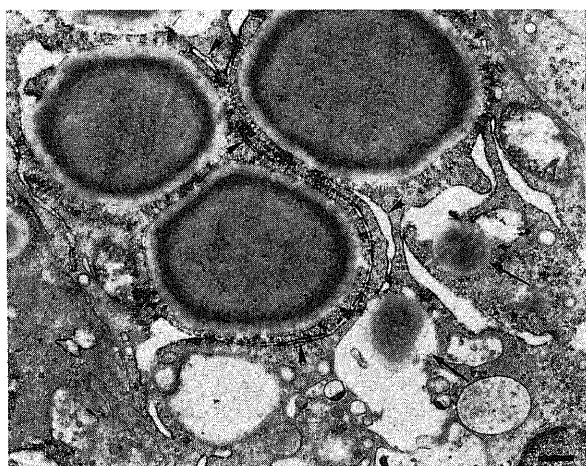


Fig. 8. Electron micrograph of a mammary gland of the ovariectomized rat. Injection of DHA-Ac (5 mg/100 g BW), 14 times in total. High power view of an epithelial cell. Note the rough-surfaced endoplasmic reticulum surrounding the large lipid droplets (arrowheads). Small lipid droplets can be observed in the dilated rough-surfaced endoplasmic reticulum (arrows). Scale bar indicates 0.5 μ m.

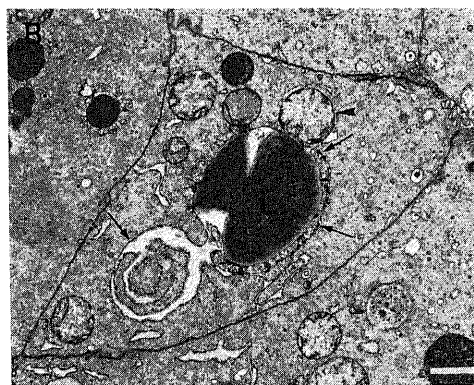
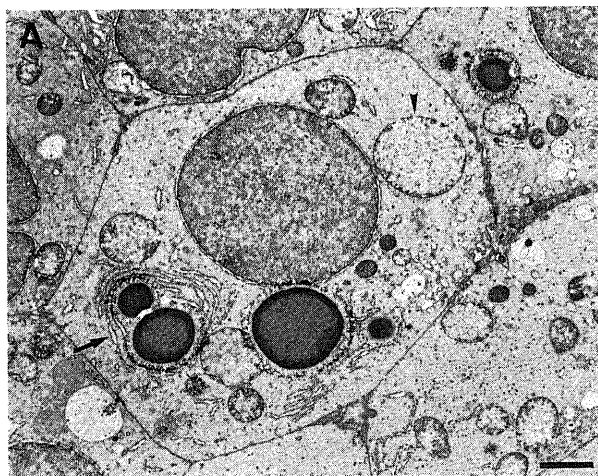


Fig. 9. Electron micrographs of a mammary gland of the ovariectomized rat. (A) Injection of DHA-Ac (5 mg/100 g BW), 28 times in total. A view of the epithelial cells. The cytoplasm shows little organization. Note the lipid droplets surrounded by concentric arrays of rough-surfaced endoplasmic reticulum (arrow). A giant mitochondrion is demonstrated (arrowhead). Scale bar indicates 2 μ m. (B) The same rat as in (A). Portion of circular or doughnut-shaped rough-surfaced endoplasmic reticulum with focal dilatation (arrows). A lipid-like secretion (L) can be seen in the rough-surfaced endoplasmic reticulum. A mitochondrion with short cristae is also present (arrowhead). Scale bar indicates 1 μ m.

rone) などが知られている。しかしながら、DHA が乳腺に及ぼす影響を及ぼすかについて検討した報告は少なく、僅かに Marchandise⁹⁾ の報告をみるに過ぎない。それによると、体重 200g 前後の正常成熟雌ラットに DHA (2mg) を連日14日間皮下投与したところ、光顕による観察で乳腺の発育と乳汁分泌物の中等度増加が認められたとしている。

正常ラットの乳腺は性周期に伴ってその形態が変化するので¹⁰⁾、投与ホルモンの影響を検するためには、内因性ステロイドホルモンの影響を除くことが望ましい。また、ラットでは副腎皮質からの DHA 分泌はほとんど認められず、その大部分は卵巣由来のものであるので¹¹⁾、去勢によって内因性の DHA はほとんど消失するものと考えられる。したがって、今回の実験のように去勢された雌ラットを用いることは、DHA の作用を検討する上で有用な方法であると考えられた。なお、今回 DHA の投与量を決めるにあたっては、Pellion ら¹²⁾ の報告を参考にした。すなわち、Pellion らは DHA 投与に際しては、その投与量が重要であり、DHA 0.6~3mg/日ならばプロラクチンを分泌させるのに十分であり、0.03mg/日では無効であったと報告している。この点を考慮して、本実験の DHA 投与量は、少量投与群では1回投与あたり 0.1~0.3mg/日、多量投与群では 5~15mg/日とした。

乳腺の発育に関する光顕的研究によると、エストロゲンは腺管の発育に、プロゲステロンはエストロゲンの存在下で腺房の発育に関与するとされている¹³⁾。また、プロラクチンはこれらのホルモンによって形態的に完成された段階の乳腺にのみ強い

分泌機能を発揮させるといわれている。今回の光顕的観察では、DHA-Ac 多量投与群において、腺管、腺房の発育に加えて著明な分泌像が観察されたが、これらの乳腺像はエストロゲン、プロゲステロン、プロラクチンの3者の作用が加わった時の乳腺像に近似していた。一方、DHA-Ac 少量投与群では、腺管の発育は認めたものの典型的な腺房の発育を認めなかったのは、DHA-Ac の投与量が少なかったことに起因するものと推察された。しかしながら、去勢対照群の乳腺が急速に退縮したのに比べ、DHA-Ac 少量投与群では退縮所見はほとんど観察され

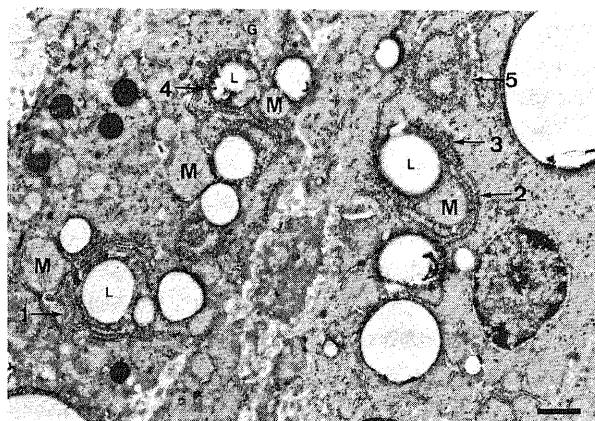


Fig. 10. Electron micrograph of a mammary gland of the ovariectomized rat. Injection of DHA-Ac (5 mg/100 g BW), 28 times in total. A survey view of the secretory epithelial cells. Although mitochondria (M) are somewhat unclear because of weak osmification, various stages of the formation of lipid droplets (L) are apparently demonstrated. Note the lipid droplet surrounded by several layers of rough-surfaced endoplasmic reticulum (arrow-1). A swollen mitochondrion is observed near the droplet. A lipid droplet and a mitochondrion are surrounded by the same several layers of rough-surfaced endoplasmic reticulum (arrow-2). Polysomes are noted around the lipid droplet (arrow-3). An irregular shaped lipid droplet and three vacuoles containing small proteinous granules are surrounded by the same rough-surfaced endoplasmic reticulum (arrow-4). Nearby these, a mitochondrion and a Golgi apparatus (G) can be observed. Spiral accumulation of many polysomes can also be noted (arrow-5). Scale bar indicates 2 μ m.

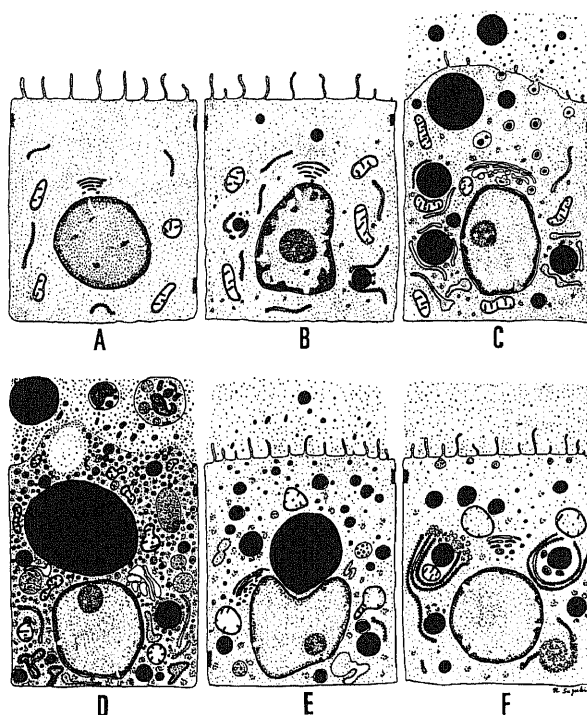


Fig. 11. Diagrammatic representation of the secretory mechanism of the biovariectomized rat mammary glands after DHA-Ac administration. (A) Before DHA-Ac treatment (60-day old rat). (B) Injection of DHA-Ac (5 mg/100 g BW), 1 time in total. The nucleus is irregular and has a prominent nucleolus. Several lipid droplets appear in the cytoplasm. (C) Injection of DHA-Ac (5 mg/100 g BW), 3 times in total. An increased number of free ribosomes and polysomes are present in the cytoplasm. There are many lipid droplets and protein secretory granules, some of which are secreted into the lumen. (D) Injection of DHA-Ac (5 mg/100 g BW), 7 times in total. Stasis vacuoles containing protein secretory granules are present. Large lipid droplets stored in the cytoplasm are also seen. In the lumen, there are many protein secretory granules which have regular periodic band pattern. Microvilli are short and not well seen. Many lysosomes are present. (E) Injection of DHA-Ac (5 mg/100 g BW), 14 times in total. Secretory materials are stored in the cytoplasm. Early involutional changes have occurred. Mitochondria are swollen and have short crista. (F) Injection of DHA-Ac (5 mg/100 g BW), 28 times in total. Characteristic involutional changes are observed. The cytoplasm shows little organization. The lipid droplets are surrounded by several layers of rough-surfaced endoplasmic reticulum. Nearby these, swollen mitochondria and polysomes are observed. Spiral accumulation of many polysomes is evident.

ず、むしろ正常静止期乳腺の像に近似していた。このことから、DHA-Ac は今回の少量投与の相当量でも乳腺に対しては十分作用するものと解された。

乳腺の超微細構造に関する研究は、静止期、妊娠中、授乳期、断乳の各期に分け詳細に検討されているが¹³⁾、エストロゲンやプロゲステロンなどの性ホルモンを投与した際の変化を観察した報告はほとんど見られない。本実験の DHA-Ac 多量投与群において、7 回投与群までは細胞内のポリゾームや遊離リボゾームの増加が観察されたが、これはこれまで報告されている授乳期の乳腺像¹³⁾と極めて近似していた。しかし、粗面小胞体の発育は悪く、授乳期にみられるような長く平行に走る層状構造をとることは少なかった。

今回 DHA-Ac 多量投与群において、投与回数が 7 回までは乳腺は著しい発育を示したが、14 回に達すると乳腺の発育は停止し、28 回では退縮を来すことが示された。すなわち、DHA はその投与量・投与回数によって、図 11 に示すごとく、乳腺上皮に対し増殖と退縮すなわち刺激と抑制の相反する作用を示した。DHA が乳腺に対し退縮あるいは抑制を示した報告としては、Ben-David ら¹⁴⁾のものがある。すなわち、ラット (Sabra 系) の産褥 7 日目から 20 日目にかけて DHA (0.1mg/100g 体重/日) を皮下投与すると、DHA は強力な乳汁分泌抑制ホルモンとして作用し、乳汁分泌が著しく抑制されたとし、これは乳腺上皮細胞がプロラクチンに対するホルモン感受性を失ったことによるとしている。また、DHA-Ac のこのような作用は膺上皮の粘液生成においても認められ、教室の杉田¹⁵⁾は去勢雌ラットに DHA-Ac を 1 日 1 回 5mg 投与すると、膺上皮の粘液生成 (mucification) は 7 回投与でピークに達し、14 回投与では逆に粘液生成が著減するとしている。したがって、乳腺や膺上皮は DHA-Ac の適量では刺激され、過量では抑制されるものと考えられる。本実験における乳腺の発育は、DHA 投与に伴うプロラクチンの上昇¹⁶⁾によってもたらされたとも考えられるが、DHA の乳腺に対する退縮作用をこのことから一元的に説明することはできない。一般に乳腺上皮内や腺腔に乳汁が充満すると、乳腺はそれ以上の発育を停止し、分泌物の生成も抑制されることが知られているが、DHA-Ac 多量投与群の 14 回、28 回投与群では腺腔、膺上皮内共に分泌物が減少していたことから、DHA-Ac にみられた抑制作用を乳汁充満の機序のみによって説明することはできない。これらのことより、DHA の乳腺上皮に対する抑制作用は、DHA のもつ特有の作用である可能性がある。すなわち、DHA-Ac 多量投与群でみられたミトコンドリアの障害 (巨大化) が乳腺上皮の機能の抑制に深い関わりを持っているのではないかと考えられた。発生のある段階、ある種の培養条件下、あるいは薬物投与などによりミトコンドリアが不規則な形をとり巨大化することはよく知られている。巨大ミトコンドリアが認められたとする臓器の多くは肝臓・腎臓などであるが、子宮内膜や副腎に出現した例も報告されている^{17)~19)}。しかし、乳腺において認められたとする報告はほとんどみられない。巨大ミトコンドリアの意義については不明な点が多く、実験的には栄養障害、酸素欠乏等によって誘発されることがあるといわれている¹⁷⁾。今回の DHA-Ac 多量投与群において、投与回数の増加に伴って、乳腺上皮内に巨大ミトコンドリアの増加がみられた。特に DHA-Ac 28 回投与群では、細胞内小器官の著しい減少が認められ、細胞がいわゆる慢性機能低下の状態に陥っていたことから、巨大ミトコンドリアが乳

腺上皮の機能低下と深い関わりがあるものと考えられた。なお、教室の林¹⁹⁾は副腎において同様の所見がみられたと報告しており、DHA の投与回数の増加に伴って副腎各層のミトコンドリアのクリスタが全般的に減少したとしている。

DHA-Ac 多量投与群の 7 回、14 回、28 回投与群では、腺腔内に縞模様 (band pattern) または点模様 (dot pattern) を有するタンパク性分泌物が観察された。これらの分泌物はカゼイン粒子と推察されたが、一般にカゼイン粒子は小さなサブユニット (subunit) 構造の集合体であり、今回認められたようなパターンを観察した報告はあまりみられない。これら縞状構造については、1) 固定による人工産物、2) タンパク性分泌物の変性、3) 電子線の干渉像、4) 結晶状物質の付着などが考えられるが、今回注意深く行った灌流固定による標本においても縞状構造は観察されたことにより 1) の可能性は低いと考えられた。また、胞体内の分泌物や貯留空腔内の変性タンパクに縞状構造はほとんどみられず、腺腔に分泌されているタンパク性分泌物にのみ観察されたことにより 2) の可能性も低いと思われた。カゼイン粒子の電顕像はこれまで数多く発表されているが、このような干渉縞の報告はほとんどみられないことから 3) の可能性も低いと思われた。したがって、これは 4) の結晶状物質、すなわち膺上皮から分泌された何らかの酵素が結晶体となってカゼイン粒子に付着した像ではないかと推察された。

DHA-Ac 投与に伴う間質的特徴的な変化として、肥満細胞の増加が認められた。肥満細胞は一般に血管新生を誘発する上で重要な働きをしていると考えられ、化学伝達物質 (chemical mediator) の生成、貯蔵及び遊離機能を持つとされている。肥満細胞から遊離される化学伝達物質としてはヒスタミン (histamine)、セロトニン (serotonin)、ヘパリン (heparin)、プロスタグランジン (prostaglandin)、タンパク分解酵素をはじめとする酵素類、好酸球遊走因子等が挙げられている²⁰⁾。組織における肥満細胞の数は各種ホルモンと密接な関係があるとされ、一般にコルチゾール、エストロゲン、テストステロン投与などで減少するといわれているが²⁰⁾、今回の DHA-Ac 投与では逆に増加している点が特徴的であった。

乳腺における脂肪滴の生成過程については未だ不明な点が多く、ヒトではもちろん実験動物においても、上皮細胞内に分散して存在する脂肪滴の生成途上の像は観察されていない。また、慎重な灌流固定後の超薄切片でも未だ明確に粗面小胞体内に脂肪は見いだされてはいない¹³⁾。Bargmann ら²¹⁾は、電顕所見により脂肪滴の生成には粗面小胞体やミトコンドリアが関連していると報告しているが、Bargmann らの説に対しては、粗面小胞体やミトコンドリアが単に脂肪滴に近接しているという所見からの推論に過ぎないとする反論も多い。その後、Stein ら²²⁾は授乳開始 6 日目のマウスに、標識したパルミチン酸 (palmitic acid) ならびにオレイン酸 (oleic acid) を静注し電顕オートラジオグラフィ (autoradiography) で乳腺を観察した結果、グレイン (grain) が脂肪滴、粗面小胞体、ミトコンドリアなどにみられ、脂肪滴の生成には粗面小胞体とミトコンドリアが深く関与していることを報告している。またグレインが数十分単位の極めて短い時間で出現したので、脂肪滴の合成は極めて短時間に行われていると述べている。さらに、Stein ら²³⁾は乳腺において脂肪合成に関する酵素活性が生化学的に粗面小胞体分画にあることを報告し、ミトコンドリアにおける脂肪酸合成酵素の存在も証明している。しかし、Kurosumi ら²⁴⁾は、電顕的

観察から脂肪滴生成には滑面小胞体が深く関与していると報告し、その後も滑面小胞体の関与を裏づける報告がいくつかなされている。しかし、滑面小胞体の関与はラットにおいてのみみられるとする説や、滑面小胞体は単に粗面小胞体の修飾に過ぎないとする反論も多く、また一部では脂肪滴の生成に基底細胞膜や被覆微小胞 (coated microvesicle) などが関与するとの報告もみられ¹³⁾²⁵⁾²⁶⁾、未だ見解の一致をみていない。したがって、乳腺における脂肪滴の生成は、形態学的に明確に捉えられないまま現在に至っていたが、今回 DHA-Ac 多量投与群の28回投与群において、生成途上の脂肪滴と思われる像が数多く観察された。これは、DHA-Ac 28 回投与群においては乳腺が慢性機能低下に陥り、脂肪の生成速度が非常に遅くなったために像として捉えられたものと考えられた。今回脂肪滴の生成途上の像として最も多く認められたものは、小〜中等大の脂肪滴が数層の粗面小胞体に囲まれ、それにポリゾームと腫大したミトコンドリアが近接しているという像であった。また、生成途上の脂肪滴とタンパク顆粒がともに同一の粗面小胞体に包囲されている像や粗面小胞体内に脂肪と思われる像も観察された。これらのことから、脂肪滴生成には粗面小胞体とミトコンドリアが重要な働きをしていることが形態学的に示唆され、Bargmann らの説²¹⁾および Stein らの報告²²⁾²³⁾を裏づけたものと考えられた。また、今回の電顕の所見からポリゾームも脂肪滴の生成に関与していることが示唆された。

以上、DHA と乳腺との関連についてまとめると、DHA-Ac は適量では乳腺上皮に対し促進的に作用し、過量になると抑制的に作用することが示された。また、DHA-Ac 投与による乳腺の組織学的変化を詳細に観察することは、副腎性アンドロゲンの生理学的意義の一端を解明する上で重要であると考えられた。

結 論

乳腺と副腎性アンドロゲンとの関連性の一端を知る目的で DHA-Ac を両側卵巢摘除ラットに投与し、ホルマウント法、光顕、電顕を用いて乳腺の形態学的変化について検討し、以下の成績を得た。

1. DHA-Ac 少量投与群では、腺房系の発育はみられなかったが、腺管の伸長や分岐数の増加などの腺管系の発育が認められた。また、分泌物として少量の脂肪滴の生成が認められたが、タンパク顆粒の生成はほとんどみられなかった。
2. DHA-Ac 多量投与群では、7 回投与群までは投与回数の増加に伴い乳腺は著明に増殖した。すなわち、腺管の発育と共に腺房系の著明な発育を認め、脂肪滴およびタンパク顆粒の生成が著しく増加した。しかし、投与回数が14回以上になると乳腺の増殖は停止し、退縮傾向が出現した。
3. DHA-Ac 多量投与群においては、投与回数が増えるにしたがい巨大ミトコンドリアが数多く認められた。
4. DHA-Ac 多量投与群において、投与回数が増えるにしたがい間質の肥満細胞が著増した。
5. DHA-Ac 多量投与群において、投与回数が7回以上になると、腺腔のタンパク性分泌物に規則的な縞模様 (band pattern) がみられた。
6. 今回脂肪滴の生成途上の像と思われる電顕像を捉えることができた。すなわち、小〜中等大の脂肪滴が数層の粗面小胞体に囲まれ、ポリゾームと腫大したミトコンドリアが脂肪滴に

近接している像や拡張した粗面小胞体内に脂肪と思われる像が観察された。

以上の結果より、DHA-Ac は適量では乳腺上皮に対し促進的に作用し、過量になると抑制的に作用することが示された。また、脂肪滴の生成には粗面小胞体、ミトコンドリア、ポリゾームが重要な働きをしていることが形態学的に示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました西田悦郎教授に謹んで謝意を表します。また、本研究の遂行に当たり貴重な御助言を賜りました金沢大学医学部病理学第一講座、中西功夫教授に深謝いたしますとともに、終始ご指導戴きました赤祖父一知助教授ならびに研究の遂行にご協力下さいました寺田 督講師、山口稔毅技官をはじめ教室員各位、穴田幸子、穴田広子、相川みち代、棚田留美子の各事務官に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第40回日本産科婦人科学会 (大阪, 1988) において発表した。

文 献

- 1) 西田悦郎: 産科婦人科学領域における老年医学的研究、とくに閉経後婦人における副腎性 androgen の意義と応用。日産婦会誌, 21, 887-894 (1969).
- 2) 赤須文男, 西田悦郎: Dehydroepiandrosterone の意義およびその産婦人科学的応用。産と婦, 32, 1-8 (1965).
- 3) 赤須文男: 副腎皮質性男性ホルモンことに Dehydroepiandrosterone について。産婦治療, 9, 662-666 (1964).
- 4) Silverman, S. H., Migeon, C., Rosemberg, E. & Wilkins, L.: Precocious growth of sexual hair without other secondary sexual development; "premature pubarche", a constitutional variation of adolescence. Pediatrics, 10, 426-432 (1952).
- 5) Korth-Schutz, S., Levine, L. S. & New, M. I.: Serum androgens in normal prepubertal and pubertal children and in children with precocious adrenarche. J. Clin. Endocrinol. Metab., 42, 117-124 (1976).
- 6) Hopper, B. R. & Yen, S. S. C.: Circulating concentration of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate during puberty. J. Clin. Endocrinol. Metab., 40, 458-461 (1975).
- 7) Ducharme, J. R., Forest, M. G., De Peretti, E., Sempe, M., Collu, R. & Bertrand, J.: Plasma adrenal and gonadal sex steroids in human pubertal development. J. Clin. Endocrinol. Metab., 42, 468-476 (1976).
- 8) 山崎泰弘: ホルモンの影響によるラット乳腺の形態学的変化に関する研究。岡山医会誌, 89, 1359-1380 (1977).
- 9) Marchandise, B.: Stimulation de la croissance mammaire chez la ratte par la déhydro-épi-androstérone. Ann. Endocrinol. (Paris), 27, 513-516 (1966).
- 10) Fanger, H. & Ree, H. J.: Cyclic changes of human mammary gland epithelium in relation to the menstrual cycle. An ultrastructural study. Cancer, 34, 574-585 (1974).
- 11) 村上弘一: 雌ラットにおける血中 dehydroepiandrosterone の動態に関する研究。十全医会誌, 100, 693-710 (1991).
- 12) Pellion, F. & Racadot, J.: Actions comparées de la testostérone, déhydroépiandrostérone (D. H. A.) et du sulfate

déhydroépiandrosterone sur la fonction gonadotrope hypophysaire de la ratte prépubère. *Ann. Endocrinol. (Paris)*, **26**, 419-428 (1965).

13) 森井外吉: 乳腺. 人体組織学 (小川和朗編), 第1版, 467-487頁, 朝倉書店, 東京, (1985).

14) Ben-David, M., Roderig, H., Khazen, K. & Sulman, F. G.: Effect of different steroids on lactating rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **120**, 620-623 (1965).

15) 杉田直道: Dehydroepiandrosterone 投与ラットにおける腺上皮細胞の超微構造的変化に関する研究. 十全医会誌, **88**, 798-815 (1979).

16) 大崎勝三: 副腎性 Androgen 投与のラット血中ホルモンおよび腺上皮シアル酸に及ぼす影響. 十全医会誌, **91**, 387-402 (1982).

17) 若林 隆: ミトコンドリアの病理. 蛋・核・酵, **27**, 1306-1324 (1982).

18) 上島半治: 性ホルモンに対するラット子宮内膜の超微構造的変化. 十全医会誌, **84**, 264-278 (1975).

19) 林 政宏: Dehydroepiandrosterone, estriol, HCG 投与の副腎皮質に及ぼす形態学的変化に関する研究. 十全医会誌, **87**, 698-723 (1978).

20) Asboe-Hansen, G.: Endocrine control of connective tissue. *Am. J. Med.*, **26**, 470-484 (1959).

21) Bargmann, W. & Knoop, A.: Über die Morphologie

der Milchsekretion. Licht und Elektronenmikroskopische studien an der Milchdrüse der Ratte. *Z. Zellforsch.*, **49**, 344-388 (1959).

22) Stein, O. & Stein, Y.: Formation of milk glycerides in lactating mice, studied by electronmicroscopic autoradiography. *Isr. J. Med. Sci.*, **2**, 773-778 (1966).

23) Stein, O. & Stein, Y.: Lipid synthesis, intracellular transport, and secretion. II. Electron microscopic radioautographic study of the mouse lactating mammary gland. *J. Cell. Biol.*, **34**, 251-263 (1967).

24) Kurosumi, K., Kobayashi, Y. & Baba, N.: The fine structure of mammary glands of lactating rats, with special reference to the apocrine secretion. *Exp. Cell. Res.*, **50**, 177-192 (1968).

25) Dylewski, D. P., Dapper, C. H., Valivullah, H. M., Deeney, T. W. & Keenan, T. W.: Morphological and biochemical characterization of possible intracellular precursors of milk lipid globules. *Eur. J. Cell. Biol.*, **35**, 99-111 (1984).

26) Deeney, J. T., Valivullah, H. M., Dapper, C. H., Dylewski, D. P. & Keenan, T. W.: Microlipid droplets in milk secreting mammary epithelial cells: evidence that they originate from endoplasmic reticulum and are precursors of milk lipid globules. *Eur. J. Cell. Biol.*, **38**, 16-26 (1985).

Effects of Dehydroepiandrosterone on the Mammary Gland in the Adult Female Rat: An Electron Microscopic Study Nobutaka Suzuki, Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. J. J. Med. Soc., **103**, 47—56 (1994)

Key words dehydroepiandrosterone, lipid droplet, mammae, rat, ultrastructure

Abstract

The purpose of this study was to examine the morphological effects of dehydroepiandrosterone (DHA) on the mammary gland. After female Wistar rats were ovariectomized on the 50th day of age, the rats received a chronic administration of dehydroepiandrosterone-acetate (DHA-Ac) 3 times a week with different doses and periods (a total of 1, 3, 7, 14 or 28 times of 0.1 mg or 5 mg per 100 g body weight, subcutaneously) starting from the 60th day of age. These rats were sacrificed and the mammary glands were studied by the whole mount preparation method and light or electron microscopy. In a small dose group, some extension and branching of the ducts was observed, while no obvious alveolar development was observed. Lipid droplets in the epithelial cells increased moderately, but protein granules were not found. In a large dose group, not only marked alveolar development, but also a certain amount of ductal growth was observed. The lipid droplets and the protein granules in the epithelial cells increased markedly, and the lumen was filled with these secretions. The mammary gland's development ceased at 14 administrations, and involutinal changes were found at 28 administrations. In the stroma, infiltration of many mast cells could be observed. In addition, a view of early stages of lipid droplet synthesis were observed in the present observation. Small and medium-sized droplets were surrounded by several layers of rough-surfaced endoplasmic reticulum, while polysomes and swollen mitochondria were in close apposition to the droplets. The present results indicate that DHA may have stimulatory effects on the mammary gland growth at small doses and inhibitory effects at large doses, and that the lipid droplet formation is in close association with rough-surfaced endoplasmic reticulum, polysomes and mitochondria.